

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

B E E I N F L U S S U N G

D E R F O L A T R E D U K T A S E

D U R C H T R I A M T E R E N U N D

T R I A M T E R E N D E R I V A T E

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Vera Mikolajewski aus Berlin

1968

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

B E E I N F L U S S U N G

D E R F O L A T R E D U K T A S E

D U R C H T R I A M T E R E N U N D

T R I A M T E R E N D E R I V A T E

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Vera Mikolajewski aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier

Referent: Professor Dr. med. Hans Herken

Korreferent: Professor Dr. med. Martin K r a m e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 30. Mai 1968

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung
II	Methodik
	1) Tiermaterial
	2) Fermentpräparation
	3) Präparation der Dihydrofolsäure
	4) Bestimmung der Fermentaktivität
	5) Aktivitätsberechnung
	6) Hemmungsanalyse
	7) Untersuchte Substanzen, Dosierung und Applikation
	a) Triamteren
	b) 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin formiat
	c) 2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid
	d) 2,4,7-Triamino-6(3,4-dimethoxy-phenyl)-pteridin-acetat
	e) Amethopterin
	f) Folsäure
	8) Schlafversuch
	9) Statistik
III	Ergebnisse und Diskussion
IV	Zusammenfassung
V	Abbildungen und Tabellen
VI	Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550823_0015

I E I N L E I T U N G

Mit dem Triamteren (2,4,7-Triamino-6-phenyl-pteridin) wurde eine Substanz in die Therapie eingeführt, die sich nach ihrer chemischen Struktur grundlegend von den anderen Diuretika unterscheidet. Diese Verbindung zeigt Ähnlichkeit mit der Folsäure und den spezifischen Folsäureantagonisten, wie z.B. Amethopterin (Abb.1). HERKEN und SENFT stellten daher bereits 1961 die Frage, ob dieses Diuretikum nicht auch in gleicher Weise wie Amethopterin durch Hemmung des Enzyms Folatreduktase eine Blockierung Folsäure-abhängiger biochemischer Reaktionen bewirkt. Derartige Störungen müßten sich am ehesten an dem dafür besonders empfindlichen hämatopoetischen System nachweisen lassen.

Die Ergebnisse klinischer Untersuchungen über Nebenwirkungen des Diuretikum auf das blutbildende System sind aber widersprüchlich.

Den Berichten von CROSLY, RONQUILLO und ALEXANDER (1961), BABA, TUDHOPE und WILSON (1962), ESCH und KRAMMER (1963), in denen ausdrücklich auf das Fehlen derartiger Effekte hingewiesen wird, stehen die Aussagen anderer Untersucher entgegen, die eine durch Triamteren bedingte reversible Granulocytopenie (LARAGH, REILLY und STITES, 1961) bzw. eine Eosinophilie und Leukopenie beobachteten (DONNELLY, TURNER und SOWRY, 1962).

Eine Blockierung Folsäure-abhängiger Reaktionen durch Triamteren scheint nach den Untersuchungen von HITCHINGS, ELION, VANDER WERFT und FALCO (1948) prinzipiell möglich.

Sie fanden, daß Substanzen mit einem 2,4-Diamino-pyridin-kern eine "Antifolsäurewirkung" besitzen. Daß eine derartige Wirkung auch dem Triamteren zukommt, konnten ROSEN-THALE und VAN ARMAN (1963) zeigen. Sie erzielten beim Folsäure-bedürftigen *Streptococcus faecalis* 8043 durch Zusatz von 1 μ g Triamteren pro ml Nährmedium eine totale Wachstumshemmung.

Wir prüften daher in vitro und in vivo den Einfluß des Diuretikum auf die Folatreduktase in der Niere und Leber der Ratte, da aus diesen beiden Organen ohne weitere Anreicherung Fermentpräparationen mit einer zur Messung ausreichenden Enzymaktivität hergestellt werden konnten.

II M E T H O D I K

1) Tiermaterial

Als Versuchstiere verwendeten wir 100 - 180 g schwere weibliche Wistar-Ratten des Züchters Hoffmann, Berlin. Die Aktivität des untersuchten Fermentes zeigte innerhalb dieser Gewichtsklasse bei Kontroll- und Versuchstieren keine Abhängigkeit vom Tiergewicht.

Nach Lieferung durch den Züchter wurden die Versuchstiere zunächst mindestens drei Tage unter den konstanten Bedingungen des Institutstierstalls gehalten, um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Ernährungsumstellung und Umgewöhnung auszuschalten.

Die Ratten erhielten das standardisierte Trockenpreßfutter "Altromin" der Firma Altrogge und Leitungswasser ad libitum.

2) Fermentpräparation

Die Versuchstiere wurden zu den in den Tabellen und Diagrammen angegebenen Zeiten nach Applikation der untersuchten Substanzen durch Dekapitation getötet. Nach dem Entbluten erfolgte die Entnahme beider Nieren und des Mittellappens der Leber. Die Nieren wurden dekapsuliert und wie die Lebern mit dem zehnfachen Volumen 0,1 M Trispuffers vom pH 7,5 in einem Plexiglashomogenisator vom Typ POTTERELVEHJEM fünfundsiebzig Sekunden homogenisiert. Das zur Verringerung der biologischen Streuung aus den Organen jeweils zweier Tiere bestehende Mischhomoge-

nat wurde anschließend sechzig Minuten in einer SPINCO-Ultrazentrifuge der Firma Beckman bei $3 - 5^{\circ} \text{C}$ mit $105\,000 \times g$ zentrifugiert.

Der partikelfreie Überstand wurde entweder durch Dekantieren vom Bodensatz getrennt oder, falls eine aufliegende Lipoidschicht das Abgießen störte, durch eine Kanüle abgesaugt. Die überstehende Fraktion wurde ohne weitere Aufarbeitung als Fermentlösung verwendet und bis zur Durchführung der Reaktion in Eiswasser aufbewahrt.

Die Fermentherstellung erfolgte in einem Kühlraum bei $2 - 4^{\circ} \text{C}$.

Die Versuche zur Aktivitätsbestimmung wurden stets am gleichen Tag durchgeführt, spätestens drei Stunden nach der Herstellung des Fermentes, da orientierende Versuche gezeigt hatten, daß bei längerem Stehen eine Aktivitätsabnahme unterschiedlichen Ausmaßes eintritt. So fanden wir nach zwanzig Stunden bei einem Kontrollferment eine Aktivitätsabnahme von 19 %, bei einem aktivierten Enzym von 32 %, bei einem bereits gehemmten von 8 %.

3) Präparation der Dihydrofolsäure.

Die für die Reaktion benötigte Dihydrofolsäure wurde nach FUTTERMAN (1957) aus Folsäure durch Reduktion mittels Dithionit in ascorbinsaurer Lösung hergestellt. Die Substanz wurde als Suspension in 0,005 n Salzsäure im Kühlschrank aufbewahrt und erst unmittelbar vor jedem Versuch in 0,1 M Trispuffer gelöst. Eine Präparation wurde niemals länger als zehn Tage nach der Herstellung verwendet.

4) Bestimmung der Fermentaktivität

In den Versuchen, in denen die Aktivität der Folatreduktase (5,6,7,8-tetrahydrofolate:NAD(P)oxido-reductase, EC 1.5.1.3) der Niere und Leber nach Applikation der Pteridinderivate untersucht wurde, enthielt der Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 0,1 M Trispuffer vom pH 7,5; die Fermentlösung; Dihydrofolsäure in einer Konzentration von $4,2 \times 10^{-5}$ M; 1×10^{-4} M NADP sowie ein NADPH + H^+ lieferndes System im Überschuß (Glucose-6-phosphat, Magnesiumchlorid und Glucose-6-phosphatdehydrogenase oder Isocitrat und Isocitratdehydrogenase), das zur Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration an reduziertem Pyridinnukleotid während der gesamten Reaktionsdauer diente. Eine Extinktionsabnahme als Folge einer Konzentrationsabnahme des Wasserstoffdonators konnte dadurch verhindert werden (Abb.2). Bei den Messungen, bei denen der Einfluß der Pteridinderivate auf die Fermentaktivität in vitro untersucht wurde, enthielten die Ansätze außer den bereits genannten Verbindungen noch die Testsubstanzen. Wegen ihrer schlechten Löslichkeit bei pH 7,5 fand ein Teil der Reaktionen bei verändertem pH-Wert statt. Als Vergleich diente in diesen Fällen die Fermentaktivität eines Ansatzes bei gleichem pH ohne Zusatz der Testsubstanz. Da Tetrahydrofolsäure bei $340 \text{ m}\mu$ eine geringere molare Extinktion besitzt als Dihydrofolsäure, stellt die Extinktionsabnahme bei dieser Wellenlänge unter den gewählten Bedingungen ein Maß für die Reduktion von Dihydro- zu Tetrahydrofolsäure dar. Wir registrierten daher in einem

Beckman-Spektralphotometer bei Zimmertemperatur den Extinktionsabfall bei $340 \text{ m } \mu$. Bei dieser Wellenlänge besitzt das reduzierte Pyridinnukleotid ebenfalls eine Extinktion, die aber bei konstanter $\text{NADPH} + \text{H}^+$ -Konzentration nicht in die Messung eingeht.

Um durch unspezifische Reaktionen bedingte Extinktionsänderungen auszuschließen, wurden Leerversuche durchgeführt, bei denen in einem sonst vollständigen Ansatz die Fermentlösung oder die Dihydrofolsäure fehlten. In beiden Fällen kam die mit dem charakteristischen Extinktionsabfall verbundene Reaktion erst nach Zugabe der fehlenden Substanz in Gang.

Den Nachweis der Identität der gemessenen Extinktionsabnahme mit der Reduktion der Dihydro - zur Tetrahydrofolsäure brachten die vor und nach der Reaktion geschriebenen Spektren eines Ansatzes. Die registrierten spektralen Veränderungen stimmten mit den von OSBORN und HUENNEKENS (1958), BLAKELEY und MCDUGALL (1961), HERKEN und TIMMLER (1964) publizierten überein.

Um die Oxydation der gebildeten Tetrahydrofolsäure zu verhindern, verwendeten wir als Reduktionsmittel entweder 2-Mercaptoäthanol wie diese Autoren oder Cysteinhydrochlorid in einer Konzentration von $1 \times 10^{-2} \text{ M}$. Während bei Anwendung von 2-Mercaptoäthanol das bei $298 \text{ m } \mu$ liegende Extinktionsmaximum der Tetrahydrofolsäure bei kontinuierlicher Registrierung die Höhe des Extinktionsmaximum der Dihydrofolsäure bei $283 \text{ m } \mu$ knapp erreichte oder sogar darunter lag, konnten wir bei der Verwendung von Cysteinhydrochlorid eine höhere Extinktion der Tetrahydrofolsäure

feststellen (Abb.3).

Die Beobachtung, daß die Tetrahydrofolsäure unter den gewählten Bedingungen bei 298 m μ einen größeren Extinktionskoeffizienten hat als die Dihydrofolsäure in ihrem Maximum bei 283 m μ , stimmt mit den Ergebnissen von PRES-COTT, WOOD und SPECK (1965) überein, die eine gereinigte Tetrahydrofolsäure in Phosphatpuffer vom pH 7,0 untersuchten, allerdings mit 2-Mercaptoäthanol als Reduktionsmittel, und einen Extinktionskoeffizienten zwischen 25 000 und 39 000 bestimmten mit einem Mittelwert von 32 000. Diese Werte liegen höher als die von O'DELL, BLOOM, VANDENBELT und PFIFFNER (1947) publizierten, die einen Extinktionskoeffizienten zwischen 19 000 und 25 000 ermittelten.

5) Aktivitätsberechnung

Der Berechnung der Aktivität können die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Dihydro- und Tetrahydrofolsäure bei 340 m μ zugrunde gelegt werden. ZAKRZEWSKI und NICHOL (1960) gaben die auf diese Weise berechnete Fermentaktivität in der Dimension mol/l/min. pro 0,2 ml Enzym an. Die in der Literatur angegebenen Differenzen der Extinktionskoeffizienten zeigen jedoch erhebliche Unterschiede. Während ZAKRZEWSKI und NICHOL (1960) eine Extinktionsdifferenz von $3,2 \times 10^3$ feststellten, ermittelten MATHEWS, SCRIMGEOUR und HUENNEKENS (1963) diese Differenz zu $5,8 \times 10^3$. In eigenen Versuchen bestimmten wir sie zu $5,2 \times 10^3$. Um die in unseren Versuchen gefundenen Ergebnisse vergleichbar zu machen, schlossen wir uns dem Vorgehen von OSBORN

und HUENNEKENS (1958) sowie MORALES und GREENBERG (1963) an und wählten als Aktivitätseinheit die auf Protein bezogene Extinktionsabnahme bei 340 m μ . Die Proteinkonzentration der Fermentlösung, die bei allen Untersuchungen für jede einzelne Fermentpräparation bestimmt wurde, war geeignet als Bezugssystem, da unsere Versuche gezeigt hatten, daß sich der Eiweißgehalt des Fermentpräparates bei gleicher Herstellung nicht wesentlich ändert. Wir definierten die Aktivität als die Extinktionsabnahme bei 340 m μ von 0,001 / min. / mg Protein. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels der von GORNALL, BARDWILL und DAVID (1949) angegebenen Biuretprobe in der Modifizierung nach JACOBS, JACOB, SANADI und BRADLEY (1956).

6) Hemmungsanalyse

Zur Analyse der Hemmwirkung von Triamteren und 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin-formiat, sowie 2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid auf die Folatreduktase wurde das Verfahren von LINEWEAVER und BURK (1934) angewendet, dem die folgende Formel zugrunde liegt.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V} ; \text{ wobei}$$

- v : die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion
 V : die maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(S) : die molare Substratkonzentration
 K_m : die Michaeliskonstante

symbolisieren.

Zur graphischen Auswertung der Meßdaten werden dabei auf der Abszisse eines Koordinatensystems die reziproken Werte der molaren Substratkonzentrationen, auf der Ordinate die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen in den gewählten Maßeinheiten aufgetragen. Mit einem Reaktionsansatz, in dem nur die Konzentration des physiologischen Substrats, der Dihydrofolsäure, variierte, wurden zunächst die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen, dann die reziproken Werte errechnet und in das Koordinatensystem eingetragen. Liegt eine Michaelisbeziehung vor, d.h. ist die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes direkt proportional, dann ergibt die Verbindung der bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelten Punkte im Koordinatensystem eine Gerade, die bei $\frac{1}{(S)}=0$ auf der Ordinate den reziproken Wert der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $\frac{1}{V}$ abteilt und den negativen Teil der Abszisse im Punkte K_m schneidet.

Vorversuche hatten gezeigt, daß diese Michaelisbeziehung für die Reduktion der Dihydro - zu Tetrahydrofolsäure durch die Folatreduktase besteht. Daher beschränkten wir uns in den weiteren Versuchen darauf, die Reaktionsgeschwindigkeit nur bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen zu messen, führten aber dafür Mehrfachbestimmungen durch.

In den Versuchen zur Hemmungsanalyse enthielt der Reaktionsansatz neben der Dihydrofolsäure noch zusätzlich die untersuchte Substanz in gleichbleibender Konzentration. Die Konzentration der Dihydrofolsäure wurde in gleicher Weise wie vorher verändert.

Nach der Messung der Anfangsgeschwindigkeiten wurden wiederum die reziproken Werte errechnet, in das Koordinatensystem eingezeichnet und die die ermittelten Punkte verbindende Gerade eingetragen.

Aus dem Verlauf der beiden Geraden kann der Typ der Hemmung bestimmt werden.

So kommen Verringerung der Affinität oder Verdrängung des physiologischen Substrats in einer Vergrößerung des K_m -Wertes zum Ausdruck. Es wird die Michaeliskonstante bei der kompetitiven Hemmung vergrößert, bleibt bei der nicht kompetitiven unverändert und wird bei der unkompetitiven verringert. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird im Falle der unkompetitiven und nicht kompetitiven Hemmung herabgesetzt und bleibt beim kompetitiven Hemmungstyp unverändert.

Bei der Überschußhemmung erhält man im $\frac{1}{v}, \frac{1}{S}$ - Diagramm keine Gerade. Eine Linearität besteht nur für sehr niedrige S-Werte, denn die Substratkonzentration tritt als Quadrat oder in höherer Potenz auf, da sie gleichzeitig Substrat und Hemmstoff darstellt.

7) Untersuchte Substanzen, Dosierung und Applikation

Die folgenden Substanzen wurden in vivo und z.T. in vitro untersucht:

a) Triamteren

Als salzsaure, körperwarmer, wäßrige Lösung wurde diese Substanz intravenös oder per os appliziert. Oral wurde in einem Volumen von 2,0 ml pro 100 g Tier eine Dosis von 20 oder 60 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Bei intravenöser Gabe betrug die Dosis 20 mg/kg Tier, eingestellt auf eine Flüssigkeitsmenge von 1,0 ml/100 g Ratte.

Das Lösungsmittel enthielt in 10 ml Gesamtvolumen 1 ml Äthanol, 2 ml 0,1 n Salzsäure und 7 ml destilliertes Wasser. Bei intravenöser Applikation wurde das destillierte Wasser durch das gleiche Quantum physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

Durch Erwärmen auf 50 - 70° C konnten in 10 ml Lösungsmittel maximal 30 mg Triamteren gelöst werden.

b) 2,4,7-Triamino-6-oxyphenyl-pteridin-formiat

Von dieser Substanz wurden 60 mg/kg Tier als wäßrige Lösung vom pH 9,5 in einem Volumen von 1 ml pro 100 g Ratte per os gegeben.

c) 2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid

d) 2,4,7-Triamino-6(3,4-dimethoxy-phenyl)-pteridin-acetat

Beide Substanzen wurden in einer Menge von 60 mg/kg Körpergewicht oral appliziert. Das Lösungsmittel hatte die gleiche Zusammensetzung wie das des Triamteren.

e) Amethopterin

10 mg der Substanz wurden in 0,7 ml 1 n Natronlauge unter Zugabe von 2 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Hinzufügen von 0,64 ml 1 n Salzsäure wurde das

Volumen mit Wasser auf 4 ml aufgefüllt. Wir injizierten 2 ml dieser Lösung pro kg Körpergewicht intravenös.

f) Folsäure

Diese Verbindung wurde als wäßrige Lösung vom pH 7,8 in einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht per os gegeben. Dabei enthielt 1 ml Lösung 3 mg Folsäure.

Die Substanzen b - f wurden nur im akuten Versuch getestet. Triamteren in einer Dosis von 60 mg/kg auch bei chronischer Applikation. In allen Versuchen erhielten die Kontrolltiere das jeweilige Lösungsmittel ohne Substanz. Eine Beeinflussung der Folatreduktase durch ein- oder mehrmalige Lösungsmittelgabe ließ sich in beiden Organen nicht nachweisen, die gemessenen Werte lagen in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Werte unbehandelter Tiere (Tab.1,2,3). Auch eine ein- oder mehrmalige Triamteren-gabe war ohne Einfluß auf das untersuchte Ferment, wenn die Tiere vierundzwanzig Stunden nach Applikation des Pharmakon getötet wurden (Tab. 1 und 2).

8) Schlafversuch

Zur Feststellung einer Induktion und / oder einer Aktivierung von Pharmaka - abbauenden Fermenten bedienten wir uns des Schlafversuchs, wie er auch von REMMER (1958) bei gleicher Fragestellung verwendet wurde.

Die Tiere zweier Versuchsgruppen erhielten eine intraperitoneale Injektion von 100 g Hexobarbital pro kg Körpergewicht.

Als Schlafdauer wurde die Zeit zwischen der Aufhebung des Stellreflexes und seinem Wiederauftreten gewertet, wobei sich jedes Tier dreimal hintereinander aus der Rückenlage aufrichten mußte. Der Versuch wurde nach elf Tagen unter den gleichen Umweltbedingungen und zur gleichen Tageszeit wiederholt. Die Tiere der einen Gruppe erhielten in den dazwischenliegenden zehn Tagen täglich 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht in dem unter II/7/a angegebenen Lösungsmittel, die der anderen Gruppe bekamen zur Kontrolle nur das Lösungsmittel.

9) Statistik

Für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurden der arithmetische Mittelwert, die Streuung und der Normalbereich ermittelt.

Der Mittelwert $\bar{x}$ wurde als Quotient der Summe aller Einzelwerte x einer Stichprobe, dividiert durch deren Gesamtzahl N nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum x$$

errechnet. Die Berechnung der Streuung s^2 erfolgte nach der Gleichung

$$s^2 = \frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{N - 1}$$

Die Quadratwurzel der Streuung ist die Standardabweichung

$$s = \sqrt{s^2} .$$

Sie liefert nach der Formel

$$\bar{x} \pm 2s$$

die Toleranzgrenzen des Normalbereiches, innerhalb dessen auf medizinisch-biologischem Gebiet übereinkunftsgemäß 95 % aller Varianten des Normalwertes liegen.

III E R G E B N I S S E U N D D I S K U S S I O N

Bei den in-vitro-Untersuchungen der Aktivität der Folatreduktase aus Leber und Niere fanden wir nach Zusatz von Triamteren eine deutliche Verlangsamung der enzymatischen Reduktion von Dihydro - zu Tetrahydrofolsäure. Die graphische Auswertung der Befunde nach LINEWEAVER und BURK (1934) (Abb.4) zeigt das typische Bild einer kompetitiven Hemmung des Fermentes durch das Diuretikum. Dabei lag die wirksame Hemmstoffkonzentration um zwei Zehnerpotenzen höher als die des spezifischen Folsäureantagonisten Amethopterin (OSBORN und Mitarbeiter, 1958; WERKHEISER, 1961; HERKEN und TIMMLER, 1965). WILMANN (1964) fand mit einer Folatreduktase aus Taubenleber eine gleichstarke Hemmung des Enzyms.

Die Übertragung dieser in vitro gewonnenen Befunde auf in-vivo-Bedingungen erscheint jedoch nur gerechtfertigt, wenn ausgeschlossen werden kann, daß die Substanz durch metabolische Prozesse verändert wird, oder wenn die Konzentration des Stoffwechselprodukts im Verhältnis zur Menge an unverändertem Pharmakon außerordentlich gering ist. Daß auch das Triamteren im Stoffwechsel Veränderungen erfährt, ist seit den Untersuchungen von WIEBELHAUS (1961) bekannt. Er beobachtete im Urin von Ratten das Auftreten nichtnäher identifizierter Triamterenmetaboliten. Auch im menschlichen Organismus wird das Diuretikum durch metabolische Prozesse verändert. LEHMANN (1965) konnte zeigen, daß nur etwa 20 % der Triamterenausscheidungsprodukte im menschlichen Harn aus unverändertem Triamteren bestehen. Über den Einfluß dieser

Metaboliten auf die Folatreduktase ist bisher nichts bekannt. Es erscheint durchaus möglich, daß im Stoffwechsel verändertes Triamteren eine wesentlich geringere Hemmwirkung auf das Enzym besitzt. JOHNS und Mitarbeiter (1964) fanden nämlich, daß selbst so fest am Enzym haftende Verbindungen wie die Folsäureantagonisten Aminopterin und Amethopterin durch Fermente der "supernatantfraction" aus Kaninchenleber eine, wenn auch sehr langsame oxydative Veränderung erfahren, und daß diese oxydierten Formen eine um ein bis drei Zehnerpotenzen schwächere Hemmwirkung gegenüber der Folatreduktase besitzen.

Wir prüften daher zunächst im akuten Versuch, ob auch in vivo nach Triamteren die Folatreduktase aus Niere und Leber der Ratte beeinflußt wird.

Bei der diuretisch nahezu maximal wirksamen Dosis von 5 mg/kg intravenös (HERKEN und SENFT, 1961) konnten wir in keinem der beiden Organe eine Beeinträchtigung des untersuchten Enzyms feststellen. Auch die orale Gabe von 20 mg/kg blieb ohne nachweisbare Wirkung auf das Ferment (Tab.4).

In der Annahme, daß bei dieser Applikationsweise bereits ein großer Teil des zugeführten Diuretikum während der Leberpassage durch Stoffwechselprozesse verändert wird und dadurch seinen hemmenden Effekt auf die Folatreduktase verliert, so daß die Konzentration an unverändertem Triamteren in den Organen für eine Fermentbeeinflussung nicht ausreicht, gaben wir die gleiche Dosis intravenös.

Auch hierbei zeigten die zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion gemessenen Werte der Enzymaktivität keinen Unterschied gegenüber den entsprechenden Werten der Kontrolltiere (Tab.4).

Erst die drastische Erhöhung der Dosis auf 60 mg / kg per os ließ eine Beeinflussung der Folatreduktase in der Leber und Niere erkennen.

Während dreißig Minuten nach Applikation der Substanz noch am Nierenferment Kontrollwerte gemessen wurden, stieg die Fermentaktivität in der Folgezeit an und erreichte zwischen der sechzigsten und neunzigsten Minute mit 170 % ihres Ausgangswertes ihr Maximum. Die weiteren Messungen zeigten zwischen der neunzigsten und hundertundfünften Minute einen steilen Aktivitätsabfall auf etwa 60 % des zugehörigen Kontrollwertes. Die Normelisierung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte relativ langsam. Erst vier Stunden nach der Triamterengabe hatte sie den Normalwert wieder erreicht (Tab.5).

Das Enzym aus der Leber zeigte dagegen nur eine Aktivitätssteigerung (Tab.6), die wie bei der Niere erst nach einer Latenzzeit von etwa dreißig Minuten einsetzte und nach sechzig Minuten ihren Höchstwert erreichte. Der Ausgangswert der Enzymaktivität stellte sich nach drei Stunden wieder ein (Abb.6).

Auffällig war der biphasische Verlauf der Fermentbeeinflussung in der Niere (Abb.5).

Dieser Effekt könnte durch Konzentrationsschwankungen des unveränderten Triamteren hervorgerufen werden. Man kann auch annehmen, daß diese unterschiedliche Beeinflussung durch Triamterenmetaboliten bedingt ist.

Wenn die an diesem Pharmakon angreifenden Stoffwechselprozesse durch subakute Verabreichung der Substanz beschleunigt werden, wie es von anderen therapeutisch angewendeten Ver-

bindungen bekannt ist, wäre zu erwarten, daß diese beschleunigte Umsetzung auch einen Einfluß auf die Folatreduktase hat.

Wir prüften daher die Aktivität des Fermentes in der Niere und Leber nach mehrmaliger Gabe von 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht und Tag.

Wie Abb. 7 zeigt, ist das Aktivitätsmaximum des Nierenenzyms am vierten Tag der Gewöhnung bereits nach dreißig Minuten erreicht, das Minimum nach sechzig Minuten. In den folgenden drei Stunden normalisiert sich die Fermentaktivität wieder.

Am siebenten Tag des Versuchs sind die Veränderungen gegenüber der einmaligen Triamterengabe noch stärker ausgeprägt. Bereits zehn Minuten nach der letzten Triamterenapplikation ist eine deutliche Fermentaktivierung erkennbar, allerdings weit geringeren Ausmaßes als am vierten Versuchstag. Auch die Enzymhemmung ist vorverlegt, jedoch nur geringfügig abgeschwächt. Nach zehnmaliger Applikation des Diuretikum sind Maxima und Minima nicht mehr mit Sicherheit nachweisbar. Auch am Leberferment ließ sich ein Gewöhnungseffekt beobachten. Mit zunehmender Dauer der Vorbehandlung ging die Aktivitätssteigerung zurück und war am zehnten Tag nicht mehr feststellbar (Abb.8).

Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen dafür, daß die nach mehrtägiger Triamterengabe beobachtete Aktivitätsänderung durch eine Beschleunigung metabolischer Vorgänge verursacht wurde.

Gestützt werden diese Befunde durch die Resultate des Schlafversuchs, bei dem die Dauer eines durch Hexobarbital ausge-

lösten Schlafes vor und nach mehrmaliger Triamterengabe bestimmt wurde (Abb.9).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß eine mehrmalige Verabreichung des Lösungsmittels allein keine wesentliche Veränderungen der Schlafdauer bewirkt.

Bei den mit dem Diuretikum vorbehandelten Tieren traten dagegen erhebliche Differenzen der vor und nach der Triamterengabe registrierten Schlafzeiten auf. Die Schlafdauer dieser Tiere war im Mittel um 35 % verkürzt (Tab.7).

In weiteren Versuchen prüften wir, ob auch durch mehrmalige Barbituratgabe eine Aktivierung der Triamteren-abbauenden Stoffwechselprozesse auslösbar wäre.

In Anlehnung an die Befund von REMMER (1958b), der nach mehrmaliger Gabe von 80 mg Phenobarbital pro kg und Tag bei der Ratte eine Steigerung des Evipanabbaus nachweisen konnte, erhielten die Tiere in unserem Versuch die gleiche Dosis Phenobarbital an fünf aufeinander folgenden Tagen subcutan injiziert und wurden am sechsten Tag zu verschiedenen Zeiten nach einer einmaligen oralen Gabe von 60 mg Triamteren / kg getötet. Unsere Untersuchungen ergaben dabei die gleichen Änderungen der Folatreduktaseaktivität wie nach viertägiger Behandlung mit 60 mg Triamteren / kg. Die Aktivitätssteigerung des Nierenfermentes setzt bereits nach dreißig, die anschließende Hemmung nach sechzig Minuten ein (Tab.8).

Eine einmalige Vorbehandlung der Tiere mit Folsäure hatte zur Folge, daß der nach einmaliger Applikation von 60 mg Triamteren / kg nach einer Stunde auftretende Aktivitätsanstieg der Folatreduktase in beiden Organen nicht mehr

nachweisbar war (Tab.9).

Bei einem Vergleich der Aktivitätsänderungen der Folatreduktase während des subakuten Versuchs fällt auf, daß Nieren - und Leberferment zwar beide im Sinne einer Gewöhnung reagieren, daß aber die in der Niere festgestellte Veränderung keine Abhängigkeit von der Aktivität des Leberenzymys erkennen läßt.

Auf Grund der vorliegenden Resultate läßt sich nicht entscheiden, ob nicht auch der Niere beim Umsatz des Triamteren eine eigene Stoffwechselleistung zukommt.

Von LEHMANN (1965) ist im menschlichen Urin als Hauptmetabolit des Triamteren das 2,4,7-Triamino-6-p-oxy-phenylpteridin beschrieben worden.

Wir untersuchten daher auch diese Substanz auf ihre Fähigkeit, die Folatreduktase zu beeinflussen.

Im in-vitro-Versuch führte auch diese Verbindung zu einer kompetitiven Hemmung des Fermentes in der Niere (Abb.10). Nach einmaliger oraler Applikation von 60 mg / kg fanden wir am Leberferment den gleichen Effekt wie nach Triamteren (Tab.10). Es kam zu einer Aktivitätssteigerung, die nach sechzig Minuten ihren Höchstwert erreichte (Abb.11). An der Folatreduktase der Niere dagegen war im untersuchten Zeitraum nur eine Aktivitätserhöhung, aber keine Hemmung nachweisbar (Abb.12, Tab.11).

Dieser Versuch spricht dafür, daß die nach Triamteren beobachtete Aktivitätssteigerung wahrscheinlich durch Metaboliten dieser Substanz bewirkt wird.

Ob das unveränderte Triamteren oder eines seiner Stoffwechselprodukte für die am Nierenferment festgestellte

Hemmung verantwortlich ist, läßt sich nicht entscheiden. Wir haben zwei weitere Triamterenderivate in unsere Untersuchungen einbezogen, die sich von der Ausgangssubstanz nur durch Substitution am Phenylring unterschieden, und hofften, dadurch Aufschluß über die Bedeutung der Substituenden zu gewinnen.

2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid hemmte nach Zusatz in vitro die Folatreduktase der Niere wie Triamteren und 2,4,7,-Triamino-6-p-oxy-phenyl-pteridin-formiat. In vivo war nach Applikation dieser Substanz und des 2,4,7-Triamino-6(3,4-dimethoxy-phenyl)-pteridin-acetat keine die Folatreduktase beeinflussende Wirkung erkennbar (Abb.10).

Der Substitution am Phenylring scheint demnach für die Beeinflussung der Folatreduktase in vitro keine größere Bedeutung zuzukommen, da alle untersuchten Verbindungen eine Hemmung zeigten. Die zu einer Hemmwirkung gleichen Ausmaßes erforderliche Konzentration lag allerdings beim Triamteren um eine Zehnerpotenz niedriger als bei den anderen Pteridin-derivaten.

Die gewonnenen Ergebnisse gestatten auch die Aussage, daß die Beeinflussung des untersuchten Nierenenzym nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der diuretischen Wirkung des Pharmakon steht. Eine Hemmung des Fermentes als Ursache der Diurese ließ sich schon deshalb ausschließen, weil weder in experimentellen noch in klinischen Arbeiten eine derartige Nebenwirkung des spezifischen Folsäureantagonisten Amethopterin beschrieben worden ist.

In unseren eigenen Versuchen zeigte das Nierenferment sech-

zig Minuten nach intravenöser Gabe von 5 mg Amethopterin pro kg Körpergewicht eine fast vollständige Hemmung, ohne daß sich ein diuretischer Effekt nachweisen ließ (SENFT, 1965).

Auch eine Aktivierung des Enzyms kann für die diuretische Wirkung nicht verantwortlich gemacht werden.

2,4,7-Triamino-6-p-oxy-phenyl-pteridin-formiat, das nur ein Viertel der diuretischen Wirksamkeit des Triamteren besitzt, führte in unseren Versuchen zu einer Aktivitätssteigerung der Folatreduktase in vivo.

Auch der unterschiedliche zeitliche Ablauf der durch Triamteren bewirkten Diurese und Fermentbeeinflussung spricht gegen eine Abhängigkeit dieser Vorgänge voneinander. Die Diurese beginnt vor einer nachweisbaren Aktivitätsänderung der Folatreduktase und überdauert die Aktivierung und Hemmung des Enzyms.

Außerdem war der diuretische Effekt bei einer Dosis von 10 mg Triamteren pro kg maximal (SENFT, 1965), während zur Beeinflussung der Folatreduktase mehr als 20 mg / kg benötigt wurden.

Ferner blieb das von uns ebenfalls in vitro untersuchte 2,4,7-Triamino-6(3,4-dimethoxy-phenyl)-pteridin-acetat, das etwa 50 % der diuretischen Wirksamkeit des Triamteren besitzt, ohne Einfluß auf die Folatreduktase der Niere (Tab.12).

IV ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Beeinflussung der Folatreduktase (5,6,7,8-tetrahydrofolate:NAD(P)oxidoreduktase, EC 1.5.1.3) durch Triamteren und am Phenylring substituierte Triamterenderivate in vitro und in vivo untersucht. Als Fermentlösung wurde die durch hochtouriges Zentrifugieren aus homogenisierten Rattennieren und -lebern gewonnene "supernatant fraction" verwendet.

Die Aktivität des Enzyms wurde im optischen Test bei 340 m μ an der Umwandlungsgeschwindigkeit der Dihydro- zu Tetrahydrofolsäure gemessen.

Triamteren, 2,4,7-Triamino-6-p-oxy-phenyl-pteridin-formiat und 2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid führten in vitro zu einer kompetitiven Hemmung der Folatreduktase.

Bei der diuretisch maximal wirksamen Dosis von 10 mg Triamteren pro kg Körpergewicht war in vivo an den untersuchten Fermenten beider Organe kein Effekt nachweisbar.

Die Erhöhung der Dosis auf 60 mg pro kg bewirkte am Leberferment eine kurzfristige Aktivierung, die nach mehrmaliger Applikation der Substanz abgeschwächt und schließlich aufgehoben wurde.

Am Nierenferment beobachteten wir nach einmaliger Gabe von 60 mg Triamteren / kg einen biphasischen Verlauf:

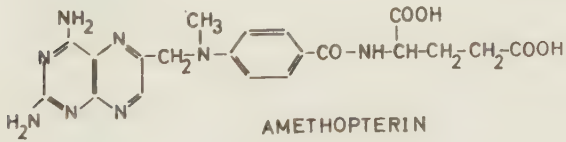
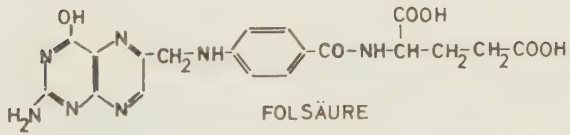
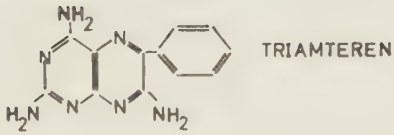
Es kam zunächst zu einer Aktivitätssteigerung, der eine Aktivitätsabnahme folgte. Nach mehrmaliger Triamterenverabreichung traten beide Effekte in abgeschwächter Form und zeitlich früher auf. Auch hier war nach mehrmaliger Applikation eine Fermentbeeinflussung nicht mehr feststellbar.

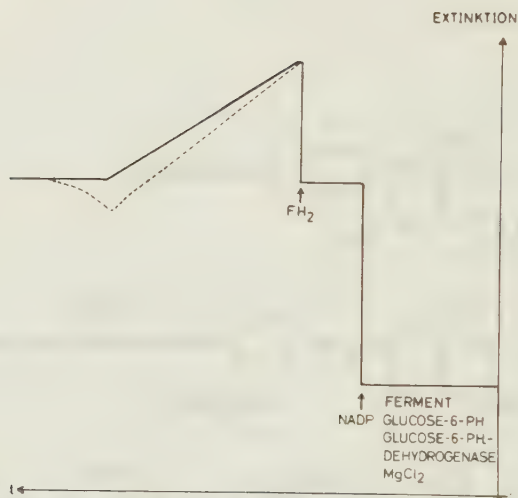
Die Verkürzung der durch Hexobarbital erzeugten Narkose nach mehrmaliger Triamterengabe stützt die Annahme beschleunigter am Diuretikum angreifender metabolischer Prozesse.

Das als Metabolit des Triamteren beschriebene 2,4,7-Triamino-6-p-oxy-phenyl-pteridin zeigte nach einmaliger Gabe in beiden Organen eine Aktivitätssteigerung der Folat-reduktase.

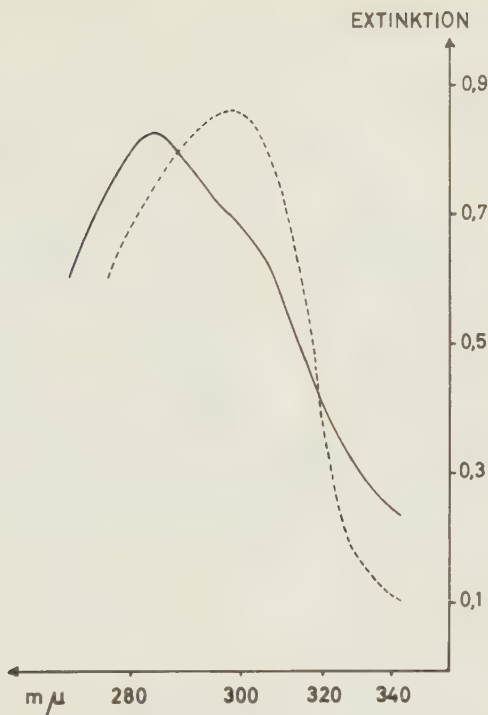
2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid und 2,4,7,-Triamino-6-(3,4-dimethoxy-phenyl)-pteridin-ace-tat waren in vivo ohne Effekt.

Aus dem Vergleich der diuretischen Wirksamkeit der unter-suchten Substanzen und ihrer Fähigkeit, die Folatreduktase in vivo zu beeinflussen, geht hervor, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen beiden Effekten nicht besteht.



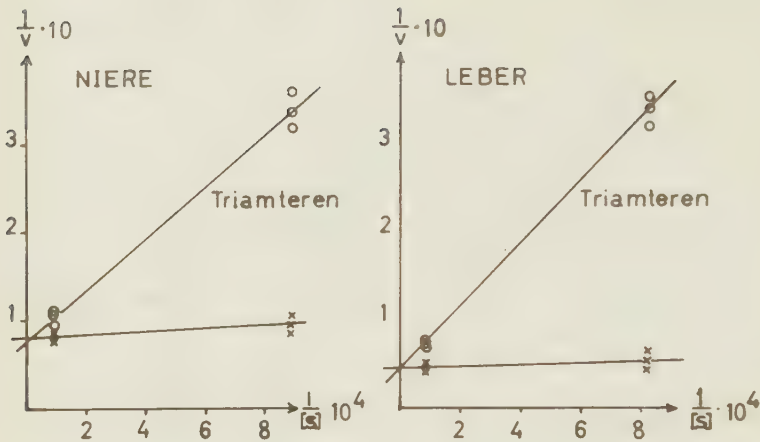


Halbschematische Darstellung der als Extinktionsabnahme bei 340 m μ registrierten Reduktion der Dihydro - zu Tetrahydrofolsäure durch die Folatreduktase aus Rattenniere. Bei dieser Wellenlänge wurden in einem Beckman - Spektralphotometer die Extinktionen eines Reaktionsansatzes vor und nach der Zugabe von NADP und Dihydrofolsäure (FH_2) bestimmt. Ferner wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten zweier Ansätze gemessen, von denen der eine das $NADPH + H^+$ regenerierende System im Überschuß (—), der andere in einer Konzentration enthielt, die zur Konstanterhaltung der Konzentration des Wasserstoffdonators während der gesamten Reaktionsdauer nicht ausreichte (----).



Umwandlung der Dihydrofolsäure (—) zu Tetrahydrofolsäure (-----) durch Folatreduktase aus Rattenniere.

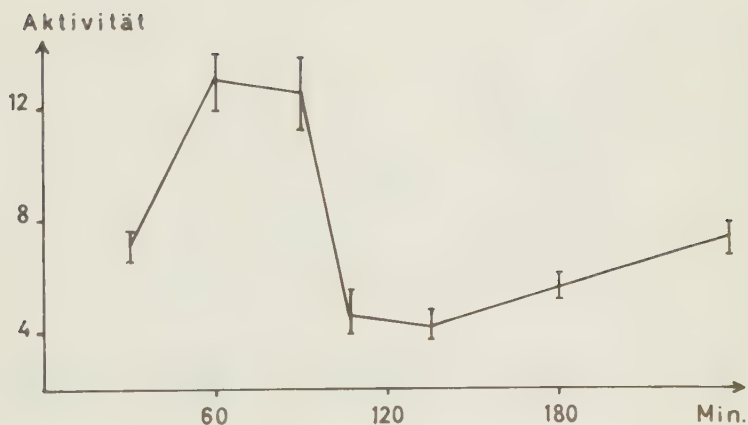
Es wurden die UV-Spektren eines Reaktionsansatzes vor Beginn und nach Beendigung der Reaktion in einem Beckman-Spektralphotometer registriert. Die Meßkuvette enthielt in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 0,1 M Trispuffer vom pH 7,5; 1×10^{-4} M NADP; 1×10^{-3} M Glucose-6-phosphat und MgCl_2 ; 0,1 mg Glucose-6-phosphatdehydrogenase; Dihydrofolsäure in der aus der Abbildung ersichtlichen Konzentration; 0,1 ml der Fermentlösung sowie 1×10^{-2} M Cysteiniumhydrochlorid als Reduktionsmittel. Die Vergleichskuvette enthielt den gleichen Ansatz ohne Dihydrofolsäure.



Hemmung der Folatreduktase aus Niere und Leber der Ratte durch Triamteren.

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 0,1 M Trispuffer vom pH 7,5; 1×10^{-3} M MgCl_2 ; 1×10^{-3} M Glucose-6-phosphat oder Isocitrat; 0,01 mg Glucose-6-phosphatdehydrogenase oder 0,02 ml Isocitratdehydrogenase; 1×10^{-4} M NADP; Dihydrofolsäure in den aus den Diagrammen ersichtlichen Konzentrationen sowie 0,1 ml der Nieren- oder Leberfermentpräparation.

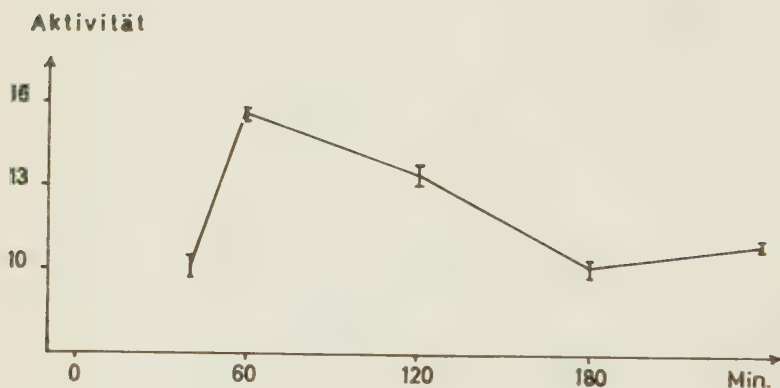
Die Triamterenkonzentration betrug in den Versuchen zum Nachweis einer Fermenthemmung $4,4 \times 10^{-6}$ M.



Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenniere nach einmaliger oraler Applikation von 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden zu den im Diagramm angegebenen Zeiten nach der Triamterengabe getötet. Die Fermentpräparation und Bestimmung der Enzymaktivität erfolgten auf die in der Methodik beschriebene Weise.

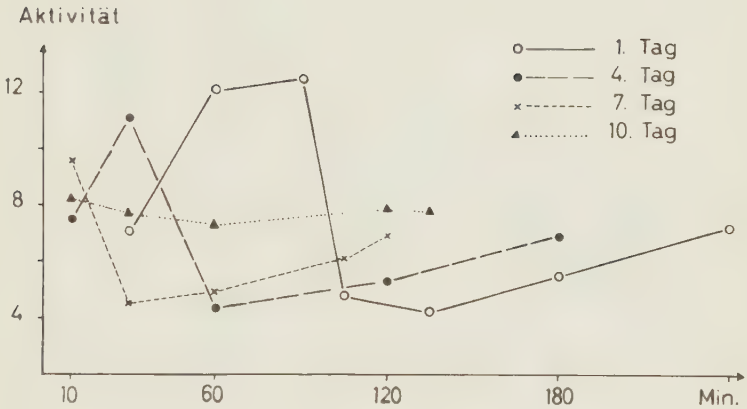
Es wurden die Normalbereiche der zu den jeweiligen Zeiten gemessenen Aktivitätswerte zeichnerisch dargestellt.



Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenleber nach einmaliger oraler Applikation von 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht.

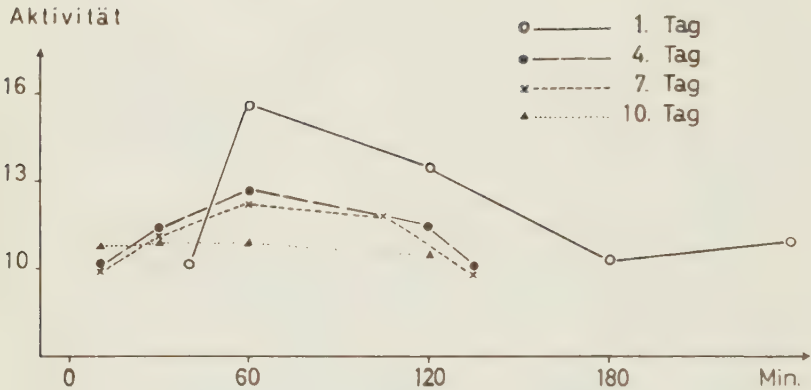
Die Tiere wurden zu den aus dem Diagramm ersichtlichen Zeiten nach der Triamterengabe getötet. Die Fermentpräparation und Aktivitätsbestimmung wurden auf die in der Methodik beschriebene Weise durchgeführt.

Es wurden die Normalbereiche der zu den einzelnen Zeiten gemessenen Aktivitätswerte aufgetragen.



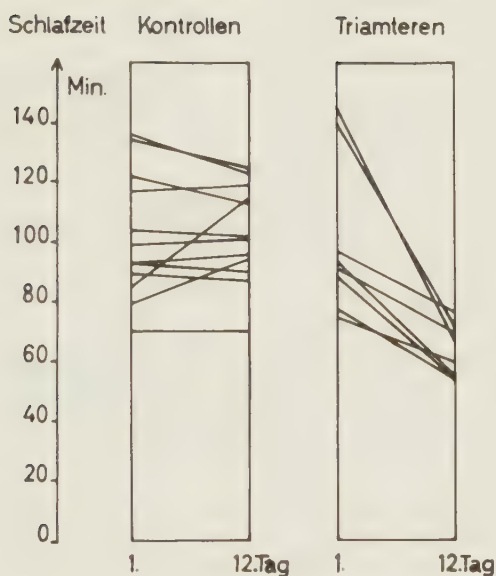
Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenniere nach ein- und mehrmaliger Triamterengabe.

Die Tiere wurden am ersten, vierten, siebten bzw. zehnten Tag nach vorangegangener täglicher Behandlung mit 60 mg Triamteren/kg Körpergewicht per os zu den aus dem Diagramm ersichtlichen Zeiten nach der letzten Triamterenapplikation getötet. Die Isolierung des Enzyms und die Bestimmung der Aktivität erfolgten wie in der Methodik angegeben.

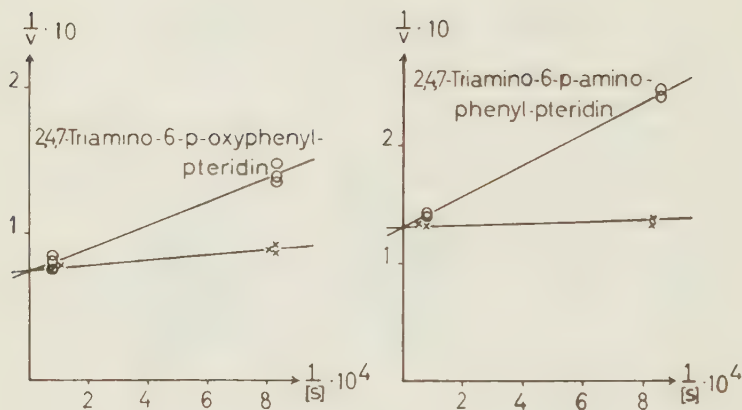


Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenleber nach ein- und mehrmaliger Triamterenapplikation.

Die Tiere wurden am ersten, vierten, siebten bzw. zehnten Tag nach vorangegangener täglicher Behandlung mit 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht per os zu den aus dem Diagramm ersichtlichen Zeiten nach der letzten Triamterengabe getötet. Die Isolierung des Enzyms und die Bestimmung der Aktivität erfolgten wie in der Methodik ausgeführt.

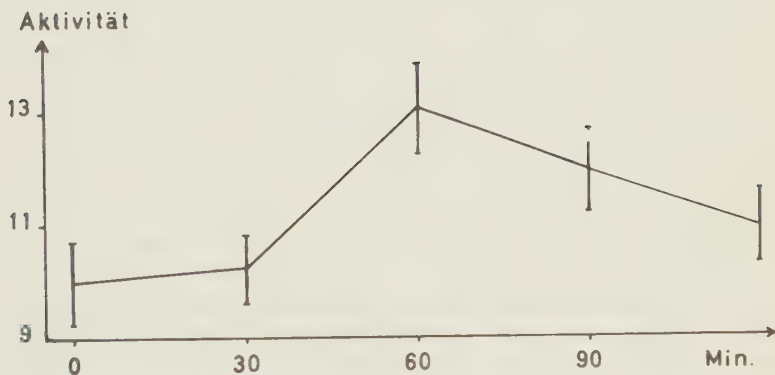


Vergleich der Dauer eines durch Hexobarbital ausgelösten Schlafes vor und nach zehntägiger Triamterenbehandlung. Die Tiere der Triamterengruppe erhielten vom zweiten bis zum elften Tag täglich 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht oral appliziert, die Kontrolltiere nur das Lösungsmittel.



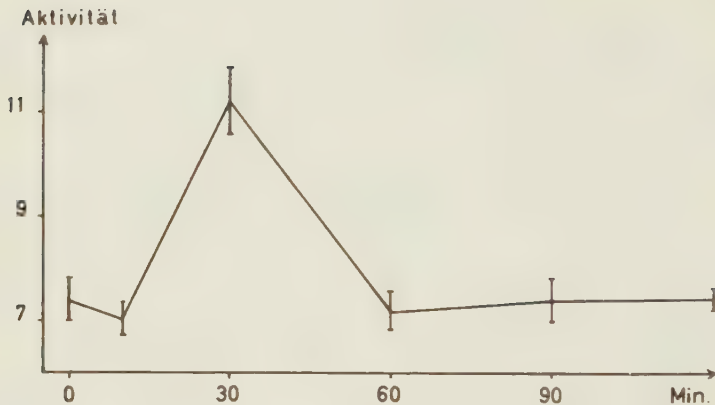
Hemmung der Folatreduktase der Rattenleiere durch 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin-formiat und 2,4,7-Triamino-6-p-amino-phenyl-pteridin-hydrochlorid.

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 3,0 ml 0,1 M Trispuffer vom pH 7,5; 1×10^{-3} M Glucose-6-phosphat und MgCl_2 ; 0,015 mg Glucose-6-phosphatdehydrogenase; 1×10^{-4} M NADP; Dihydrofolsäure in den aus den Diagrammen ersichtlichen Konzentrationen sowie 0,1 ml der Fermentpräparatio. Die Konzentrationen der Hemmstoffe und die pH-Werte der Ansätze betrugen bei der 6-oxy-Verbindung 3×10^{-5} M und 8,7; bei der 6-amino-Verbindung $1,5 \times 10^{-5}$ M und 7,3.



Änderung der Folatreduktase aus Rattenleber nach einmaliger oraler Gabe von 60 mg 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphe-nyl-pteridin-formiat pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Appli- kation der Substanz getötet. Die Fermentisolierung und Ak- tivitätsbestimmung erfolgten wie in der Methodik beschrie- ben. Es wurden die Normalbereiche der zu den angegebenen Zeiten bestimmten Aktivitätswerte eingezeichnet.



Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenniere nach einmaliger oraler Gabe von 60 mg 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin-formiat pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Applikation der Substanz getötet. Die Fermentisolierung und Aktivitätsbestimmung erfolgten wie in der Methodik beschrieben.

Es wurden die Normalbereiche der zu den angegebenen Zeiten gemessenen Aktivitätswerte im Diagramm dargestellt.

Tabelle 1

A	B	C	D
6,90 7,31	6,99 7,11 7,31	6,90	6,92
6,90 7,43	7,00 7,15 7,32	6,90	6,99
7,05 7,45	7,00 7,18 7,32	6,92	7,05
7,12 7,58	7,00 7,20 7,37	7,05	7,10
7,12	7,05 7,20 7,41	7,01	7,20
7,18	7,10 7,25 7,50	7,18	7,26
7,20	7,10 7,25 7,50	7,18	7,31
7,27	7,10 7,28	7,30	7,48
7,28	7,10 7,29		7,48
$\bar{x} \pm 2s: 7,21 \pm 0,56$	$7,20 \pm 0,43$	$7,06 \pm 0,57$	$7,20 \pm 0,36$

Vergleich der Aktivität der Folatreduktase aus Nieren un-
behandelter Tiere (Gruppe A) und von Ratten, die zehn bis
zweihundertundvierzig Minuten nach einmaliger oraler (Gruppe B)
oder intravenöser (Gruppe C) Gabe des unter II/7/a angege-
benen Lösungsmittels bzw. zehn bis hundertundzwanzig Minu-
ten nach einmaliger oraler Applikation des unter II/7/b
beschriebenen Lösungsmittels (Gruppe D) getötet wurden.

Tabelle 2

A		B	C	D
9,95	10,22	9,99	9,80	9,65
10,02	10,30	10,00	9,80	9,92
10,05	10,36	10,00	9,90	10,00
10,10	10,39		10,20	10,30
10,19	10,40		10,20	10,59
10,20	10,44		10,20	10,99
10,20	10,44			11,00
$\bar{x} \pm 2s: 10,23 \pm 0,48$		$9,997 \pm 0,01$	$10,35 \pm 1,06$	$10,02 \pm 0,01$

Vergleich der Aktivität der Folatreduktase aus Rattenleber.

Die Tiere der Gruppe A wurden zehn bis zweihundertundvierzig Minuten nach einmaliger oraler Applikation des unter II/7/a angegebenen Lösungsmittels getötet, die Tiere der Gruppe B vierundzwanzig Stunden nach drei-, sechs- und neunmaliger Gabe des gleichen Lösungsmittels, die Tiere der Gruppe C zehn bis einhundertundzwanzig Minuten nach einmaliger oraler Verabfolgung des unter II/7/b angeführten Lösungsmittels und die Tiere der Gruppe D vierundzwanzig Stunden nach drei-, sechs- und neunmaliger Gabe von 60 mg Triamteren/kg Körpergewicht per os.

Tabelle 3

Tage	A	B
3	7,20 7,19	6,90 7,40 7,50
$\bar{x} \pm 2s$:		$7,27 \pm 0,52$
6	7,38	6,94 6,95 6,95 7,04
$\bar{x} \pm 2s$:		$6,97 \pm 0,1$
9	6,73	7,12 7,32 8,10
$\bar{x} \pm 2s$:		$7,51 \pm 1,10$

Vergleich der Aktivität der Folatreduktase aus Nieren von Ratten, die drei, sechs oder neun Tage das unter II/7/a angegebene Lösungsmittel (Gruppe A) oder drei, sechs, neun Tage täglich 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht per os erhalten hatten (Gruppe B).

Die Tiere wurden jeweils vierundzwanzig Stunden nach dem letzten Sondieren getötet.

Tabelle 4

Minuten	10	30	60	90	120
Niere, intra- venös	6,80	6,92	6,90	6,86	-
	6,80	7,00	6,96	6,92	
	6,92	7,05	7,00	7,00	
	6,95	7,10	7,10	7,04	
	7,18				
$\bar{x} \pm 2s$:	6,93 $\pm$ 0,31	7,02 $\pm$ 0,28	6,99 $\pm$ 0,17	6,96 $\pm$ 0,49	
Niere, oral	-	-	7,00	-	6,99
			7,00		7,00
			7,02		7,04
			7,30		
			7,44		
			7,50		
$\bar{x} \pm 2s$			7,21 $\pm$ 0,46		7,01 $\pm$ 0,04
Leber, oral	-	-	10,00	-	10,21
			10,20		10,30
			10,30		10,58
			10,40		
$\bar{x} \pm 2s$			10,23 $\pm$ 0,49		10,36 $\pm$ 0,60

Aktivität der Folatreduktase aus Niere und Leber der Ratte nach einmaliger oraler bzw. intravenöser Gabe von 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht.

Tabelle 5

in.	30	60	90	105	135	180	240	300
	7,00	11,28	11,48	4,43	4,03	5,54	7,14	6,93
	7,10	11,50	12,12	4,60	4,12	5,70	7,18	
	7,18	11,58	12,40	4,61	4,20		7,25	
	7,25	11,98	12,60	4,76	4,24		7,28	
		12,42	13,15	4,80	4,26		7,31	
		12,44	13,30	4,90	4,41		7,35	
		12,45		5,00	4,41			
		12,54		5,29				
		12,64						
		12,72						
±	7,13±	12,16±	12,51±	4,80±	4,25±	-	7,25±	-
s	0,58	0,91	1,20	0,51	0,30	-	0,29	-

Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenniere nach einmaliger Triamterenabgabe.

Die Tiere erhielten 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht per os und wurden zu den in der Tabelle aufgeführten Zeiten nach dem Sondieren getötet.

Die Präparation des Fermentes und die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgten wie in der Methodik angegeben.

Tabelle 6

Min.	10	30	40	60	105	120	135	180	240
A	-	-	9,92 10,34	15,52 15,58	-	13,18 13,52 13,64	-	9,80 10,41	10, 11,
B	10,19	11,10 11,70	-	12,50 12,80	-	11,40	9,80	9,88 10,40	-
C	10,08	11,10 11,28	-	12,00 12,36	11,80	-	9,80	-	-
D	10,80	10,92 11,00	-	10,72 11,20	-	10,68 11,20	-	-	-

Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenleber nach ein- und mehrmaliger Gabe von Triamteren.

Die Tiere erhielten einmalig (Gruppe A), vier Tage (Gruppe B) oder sieben Tage (Gruppe C) bzw. zehn Tage (Gruppe D) hintereinander täglich 60 mg Triamteren / kg Körpergewicht per os. Sie wurden zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten nach der letzten Triamterenapplikation getötet. Die Fermentpräparation und die Bestimmung der Aktivität erfolgten wie in der Methodik beschrieben.

Tabelle 7

Tier Nr.	A Schlafzeit in Min.		Tier Nr.	B Schlafzeit in Min.	
	1. Tag	12. Tag		1. Tag	12. Tag
1	136	123	1	145	66
2	135	124	2	139	71
3	122	113	3	97	76
4	117	119	4	93	55
5	104	102	5	92	69
6	99	101	6	88	59
7	93	96	7	77	54
8	92	90	8	75	59
9	89	87			
10	85	115			
11	79	94			
12	70	70			
$\bar{x}$	102	103		101	64

Vergleich der Dauer eines durch Hexobarbital erzeugten Schlafes vor und nach subakuter Triamterenbehandlung. Die Tiere der Gruppe B erhielten vom zweiten bis elften Tag täglich 60 mg Triamteren pro kg Körpergewicht per os, die Tiere der Gruppe A nur das Lösungsmittel

Tabelle 8

A	B	C		
		10 Min.	30 Min.	60 Min.
6,70	7,00	7,30	8,20	4,80
6,80	7,10	7,45	9,00	4,95
7,05	7,30	7,80	9,20	5,20
7,40	7,38			
7,50	7,40			
	7,50			
$\bar{x}_{\pm}$ 7,09 $\pm$	7,28 $\pm$	7,52 $\pm$	8,80 $\pm$	4,98 $\pm$
2s 0,71	0,38	0,34	1,06	0,51

Einfluß des Triamteren auf die Folatreduktase aus Rattenniere nach fünftägiger Vorbehandlung der Tiere mit 80 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht und Tag.

Die Tiere der Gruppe B wurden zwanzig Stunden nach der letzten subcutanen Phenobarbitalinjektion getötet. Die Tiere der Gruppe C erhielten zwanzig Stunden nach der letzten Phenobarbitalgabe oral zusätzlich 60 mg Triamteren / kg und wurden zehn, dreißig und sechzig Minuten nach dem Sondieren getötet.

Die Tiere der Gruppe A erhielten zur Kontrolle physiologische Kochsalzlösung subcutan injiziert.

Die Enzympräparation und die Messung der Fermentaktivität erfolgten wie in der Methodik angegeben.

Tabelle 9

	A	B
Leber	10,20	9,50
	10,20	10,60
	10,40	10,90
	10,70	11,00
	10,90	
$\bar{x} \pm 2s$	$10,48 \pm 0,62$	$10,50 \pm 1,38$
Niere	6,90	7,00
	7,10	7,08
	7,30	7,10
	7,50	7,30
	7,50	7,60
$\bar{x} \pm 2s$	$7,26 \pm 0,52$	$7,22 \pm 0,30$

Wirkung des Triamteren auf die Folatreduktase aus Rattenleber und -niere nach einmaliger Vorbehandlung der Tiere mit 60 mg Folsäure pro kg per os.

Die Tiere der Gruppe A wurden achtzehn Stunden nach Applikation der Folsäure getötet. Die Tiere der Gruppe B erhielten achtzehn Stunden nach der Folsäuregabe zusätzlich 60 mg Triamteren / kg per os und wurden sechzig Minuten danach getötet.

Die Isolierung des Fermentes und die Messung der Aktivität des Enzyms erfolgten wie in der Methodik angegeben.

Tabelle 10

Min.	0	10	30	60	90	120
	9,70	9,80	10,00	12,65	11,60	10,60
	10,05		10,20	12,90	11,70	10,90
	10,20		10,28	13,00	12,20	11,00
			10,30	13,30	12,30	11,00
			10,30	13,30		11,20
			10,30	13,40		
			10,35	13,70		
$\bar{x} \pm$ 2s:	9,98 $\pm$ 0,68		10,25 $\pm$ 0,56	13,18 $\pm$ 0,64	11,95 $\pm$ 0,73	10,94 $\pm$ 0,64

Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenleber nach einmaliger oraler Applikation von 60 mg 2,4,7-Triamino-6-p-oxy-phenyl-pteridin-formiat pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten nach dem Sondieren getötet.

Die Isolierung des Enzyms und die Bestimmung der Aktivität erfolgten wie in der Methodik beschrieben.

Tabelle 11

Min.	0	10	30	60	90	120
7,28	6,90	11,00	6,90	7,15	7,15	
7,58	7,00	11,02	7,00	7,30	7,32	
	7,22	11,16	7,04	7,50	7,40	
		11,18	7,10	7,61	7,50	
		11,20	7,21		7,56	
		11,20	7,21			
		11,60	7,70			
$\bar{x}_{\pm}$	7,04 $\pm$	11,19 $\pm$	7,17 $\pm$	7,39 $\pm$	7,39 $\pm$	
2s	0,33	0,62	0,36	0,41	0,21	

Aktivitätsänderung der Folatreduktase aus Rattenniere nach einmaliger oraler Gabe von 60 mg 2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin-formiat pro kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden zehn, dreißig, sechzig, neunzig und hundertundzwanzig Minuten nach Applikation der Substanz getötet. Die Fermentpräparation und die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgten wie in der Methodik beschrieben.

Tabelle 12

Substanz	Diuretische Wirksamkeit in % +	Beeinflussung der Folatreduktase der Niere	
		in vitro	in vivo
Triamteren	100	Hemmung	Aktivierung mit anschließender Hemmung
2,4,7-Triamino-6(3,4- dimethoxy-phenyl)- pteridin-acetat	50	-	kein Effekt nachweisbar
2,4,7-Triamino-6-p- oxy-phenyl-pteridin formiat	25	Hemmung	Aktivierung
Amethopterin	0	Hemmung	Hemmung
2,4,7-Triamino-6-p- amino-phenyl-pteridi- n-hydrochlorid	0	Hemmung	kein Effekt nachweisbar

Diuretische Wirksamkeit von Pteridinderivaten und ihr
Einfluß auf die Folatreduktase der Rattenniere in vitro
und in vivo.

+ SENFT (1965)

VI L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) BABA,W.I., G.R.TUDHOPE,
and G.M.WILSON

Triamterene, a new diuretic drug.
II. clinical trial in oedematous
patients
Brit. Med. J. II, 760, 1962
- 2) BLAKELEY,R.L., and B.M.
MCDUGALL

Dihydrofolic reductase from strepto-
coccus faecalis R
J. Biol. Chem. 236, 1163, 1961
- 3) CROSLEY,A.P., L.RONQUILLO,
and F.ALEXANDER

Studies of a non-steroidal aldosterone
antagonist (SK&F 8542) in man
Fed. Proc. 20, 410, 1961
- 4) DONNELLY,R.J., P.TURNER,
and G.S.C.SOWRY

Clinical trial of new oral diuretic,
SK&F 8542
Lancet I, 245, 1962
- 5) ESCH,J. und J.KRAMMER

Klinischer Bericht über die Behand-
lung der kardialen Dekompensation mit
2,4,7-Triamino-6-phenyl-pteridin
(Jatropur, Triamterene)
Wien, Klin. Wschr. 75, 634, 1963
- 6) FUTTERMAN,J.

Enzymatic reduction of folic acid
and dihydrofolic acid to tetrahydro-
folic acid
J. Biol. Chem. 228, 1031, 1957

- 7) GORNALL, A.G., CH. J. BAR-
DAWILL, and M.M. DAVID
Determination of serum protein by
means of the biuret reaction
J. Biol. Chem. 177, 751, 1949
- 8) HERKEN, H. und G. SENFT
2,4,7-Triamino-6-phenylpteridin als
"Aldosteronantagonist"
Klin. Wschr. 39, 1205, 1961
- 9) HERKEN, H. und R. TIMMLER
Kinetik der Dihydrofolsäureredu-
tase aus Rattenleber und -gehirn
mit 3-APADPH + H^+ als Wasserstoff-
donator
Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 2933
1965
- 10) HITCHING, G.H., G.B. ELION
H. VANDER WERFF, and E.A.
FALCO
Pyrimidine derivatives as antago-
nists of pteroylglutamic acid (PGA)
J. Biol. Chem. 174, 765, 1948
- 11) JACOBS, E.E., M. JACOB, D.R.
SANADI, and L.B. BRADLEY
Uncoupling of oxidative phosphory-
lation by cadmium ion
J. Biol. Chem. 223, 147, 1956
- 12) JOHNS, D.G., A.C. IANNOTTI,
A.C. SARTORELLI, B.A.
BOOTH, and J.R. BERTINO
Enzymic oxidation of Methotrexate
and Aminopterin
Life Sciences 3, 1383, 1964
- 13) LARAGH, J.H., E.B. REILLY,
and T.B. STITES
Pteridine compound as an inhibitor
of aldosterone action in man
Fed. Proc. 20, 410, 1961

- LEHMANN, K. Trennung, Isolierung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten des Triamterens
Arzneimittelforschung 15, 812, 1965
- LIMEWEAVER, J.R. and The determination of enzyme dissociation constants
D.BURK
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, 1934
- MATHEWS, K., K.G.SCRIMGEOUR, "Dihydrofolate Reductase" in "Methods of Enzymology", Vol.VI, S.P.COLOWICK and N.O.KAPLAN (editors), Academic Press, New York and London, 1963
- MORALES, D.R., and D.M. Purification and properties of dihydrofolate reductase of sheep liver
GREENBERG
Biochim. Biophys. Acta (Amst.),
85, 360, 1964
- O'DELL, B.L., I.M.VANDEN- Hydrogenation of vitamin Bc (pteroylglutamic acid) and related pterines
BELT, E.S.BLOOM, and I.I.
PFIFFNER
J. Amer. Chem. Soc. 69, 250, 1947
- OSBORN, M.J., M.FREEMAN, Enzymatic reduction of dihydrofolate acid
and F.M.HUENNEKENS
J. Biol. Chem. 233, 969, 1958
- PRESCOTT, L.M., R.C.WOOD, The extinction coefficient of purified tetrahydrofolate acid
E.L.SPECK
Biochem. Biophys. Research Communic.
19, 151, 1965

- 21) SENFT, G. Unveröffentlichte Versuche 1965
- 22) REMMER, H. Die Verstärkung der Abbaugeschwindigkeit von Evipan durch Glycocorticoide
Arch. exp. Path. Pharmac. 233, 184, 1958
- 23) REMMER, H. Die Beschleunigung des Evipanabbaus unter der Wirkung von Barbituraten
Naturwissenschaften 45, 189, 1958
- 24) ROSENTHALE, M.E., and C.G. A pteridine diuretic WY-3654
VAN ARMAN J. Pharmacol. Exp. Ther. 142, 111, 1963
- 25) WERKHEISER, W.C. Specific binding of 4-amino-folic acid analogues by folic acid reductase
J. Biol. Chem. 236, 888, 1961
- 26) WIEBELHAUS, V. A potent, non-steroidal, orally active antagonist of aldosterone
Fed. Proc. 20, 409, 1961
- 27) WILMANN, W. und A. HAM- FELT Medikamentös bedingte Störungen der Blutzellreifung durch Hemmung der Enzyme des Folsäurestoffwechsels
Verhandlg. Dtsch. Gesellsch. Innere Med., 70. Kongreß, 586, 1964
- 28) ZAKRZEWSKI, S.F. and CH.A. Evidence for a single enzyme reducing folate and dihydrofolate
NICHOL J. Biol. Chem. 235, 2984, 1960

Für die Überlassung des Themas und für die
Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut be-
danke ich mich an dieser Stelle bei Herrn
Professor Dr. med. H. Herken sehr herzlich.
Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med.
R. Timmler und Herrn Professor Dr. med. G.
Senft für die mir jederzeit gewährte wert-
volle Unterstützung und Beratung bei der An-
fertigung meiner Dissertation.

Lebenslauf

Am 31.5.1942 wurde ich als drittes Kind des Friedrich Mikolajewski und seiner Ehefrau Luise geb. Hauschild in Berlin geboren.

Von 1948 bis 1954 besuchte ich die 3. Grundschule zu Berlin-Steglitz und anschließend die Paulsensschule, ein neusprachliches und mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium, an dem ich 1961 die Reifeprüfung bestand.

Im Mai desselben Jahres erfolgte meine Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. Dort legte ich im Wintersemester 1966/67 das medizinische Staatsexamen ab.

Seit Februar 1967 bin ich als Medizinalassistentin tätig.

